不等单蚤和缓慢细蚤吸血前后脂肪和非特异性酯酶的组织化学研究

寻　慧,漆一鸣[*]

（贵阳医学院生物学教研室,贵阳　550004）

摘要: **采用组织化学和显微摄影及定量图像分析技术,研究了不等单蚤** *Monopsyllus anisus*（Rothschild）**和缓慢细蚤** *Leptopsylla segnis*（Schönherr）**在新羽化和吸血后发育过程中脂肪和非特异性酯酶的分布及活性。结果显示,两种新羽化蚤脂肪主要存在脂肪体中,非特异性酯酶则主要存在于唾液腺和神经链中。不等单蚤吸血后中肠脂滴增加,非特异性酯酶活性增强,随消化时间的延长脂滴逐渐减少,但不同消化时间非特异性酯酶活性差异不显著;而缓慢细蚤吸血后中肠未见或偶见少量脂滴,非特异性酯酶活性也有增强,但酶活性低于相同消化时间的不等单蚤。卵母细胞发育过程中脂滴增多,非特异性酯酶活性逐渐增强,且不等单蚤酶活性强于缓慢细蚤的。**

关键词: **不等单蚤;缓慢细蚤;成熟过程;脂肪;非特异性酯酶;组织化学**

中图分类号: Q965　　文献标识码: A　　文章编号: 0454-6296(2005)06-0829-04

Histochemistry of fat and nonspecific esterase in newly emerged and sucked adults of rat fleas *Monopsyllus anisus*（Rothschild）and *Leptopsylla segnis*（Schönherr）

XUN Hui，QI Yi-Ming[*]（Department of Biology，Guiyang Medical College，Guiyang 550004，China）

Abstract：With histochemistry techniques and image analysis of microscope photographs，the distribution and activity of fat and nonspecific esterase（n-E）in newly emerged and sucked adults of rat fleas，*Monopsyllus anisus*（Rothschild）and *Leptopsylla segnis*（Schönherr）were studied. The results indicated that in newly emerged fleas of the two species the fat was distributed mainly in fat body，while nonspecific esterase was distributed mainly in salivary glands and nerve chain. After blood meal and digestion，in *M. anisus* a great deal of fat drops appeared in the midgut and the fat drops decreased as digestion continued，and the activity of nonspecific esterase increased，but there was no significant difference in its activity in different digestion time；while in *L. segnis*，there was few fat drops in the midgut，and the activity of nonspecific esterase also increased，but its activity was lower than that in *M. anisus* in the same digestion time. During growing up of the oocytes，the fat drops and activity of nonspecific esterase increased，and the activity of nonspecific esterase in *M. anisus* was higher than that in *L. segnis*.

Key words：*Monopsyllus anisus*；*Leptopsylla segnis*；maturation process；fat；nonspecific esterase；histochemistry

不等单蚤 *Monopsyllus anisus*（Rothschild）**是滇粤闽黄胸鼠鼠疫疫源地的较重要传播媒介(刘云鹏等,2000),缓慢细蚤** *Leptopsylla segnis*（Schönherr）**是重要的染疫蚤,对它们的研究有一定的流行病学意义。对蚤类的组织化学研究国外报道不多(**Bai,1972;Shchedrin *et al*.,1975,1978**),国内仅见漆一鸣(**1984**)对缓慢细蚤、不等单蚤和猫栉首蚤指名亚种** *Ctenocephalides felis felis*（Bouché）**精子束** PAS **反应的报道。近年来,我们应用组织化学方法研究了不等单蚤和缓慢细蚤在新羽化和吸血后发育过程中的组织化学变化(寻慧和漆一鸣,**2002，2004a,2004b**),以期为蚤类生理、生化和传病机制等的研究提供重要的基础资料。本文对这两种蚤在成熟过程中脂肪和非特异性酯酶的组织化学变化进行进一步报道。**

1　材料与方法

1.1　实验蚤种

2000 **年** 7 ~ 10 **月自贵阳市区褐家鼠** *Rattus*

基金项目:国家自然科学基金项目(39860015**)**

作者简介:寻慧,女,1976 **年** 11 **月生,湖南长沙人,硕士,讲师,研究方向为医学昆虫,**E-mail：pengchi1115@163.com

* **通讯作者** Author for correspondence，E-mail：qiyiming6259@sina.com

收稿日期 Received：2005-01-31;**接受日期** Accepted：2005-03-29

norvegicus（Berkenhout，1769）、黑线姬鼠 *Apodemus agrarius*（Pallas，1771）和小家鼠 *Mus musculus*（Linnaeus，1758）体上采集缓慢细蚤，自褐家鼠体上采集不等单蚤。参考漆一鸣（1984）方法，用小白鼠作为饲养动物，对采到的活蚤进行实验室饲养、繁殖。幼虫饲料由过 20 目筛的锯末 100 g、猪干血粉 40 g 和干酵母粉 10 g 混匀组成。

1.2 标本获取和组织化学制片方法

取幼虫饲料过 20 目筛筛取蚤茧，置于干净试管内，取 5 ~ 7 天后孵出未吸血新羽化蚤直接制片。另取新羽化蚤置放于小白鼠体上充分吸血 48 h 后取出，待其消化 24 h、48 h、72 h 后分批取出制片。

组织化学方法采用 Lillie 和 Ashbum 修正异丙醇油红方法显示中性脂肪（皮尔斯，1965），Bustone 的 α-醋酸萘酯法显示非特异性酯酶（杜卓民，1998）。石蜡切片经孵育液 37℃ 孵育 1 h 显色后即水洗封片；冰冻切片室温下孵育约 3 ~ 5 min 显色封片。对照不加底物 α-醋酸奈酚。

1.3 图像分析、显微摄影和数据统计处理

将切片标本置于全自动图像分析仪（Mias 97 图像扫描系统）中，各组测定 10 ~ 13 个样本，测定其平均黑度值，以灰度等级（0 ~ 255 级）自动记录。平均黑度值指单位面积样本的黑度大小，平均黑度值越大，表明标本着色越深。将上述标本置于 Olympus PM-10AD 显微摄影装置下拍照。用 t 检验作统计学处理。

2 结果

2.1 脂肪

2 种新羽化蚤的脂肪体内均存在均匀分布的红色脂滴（图版Ⅰ：1），不等单蚤脂肪体内尤为丰富。不等单蚤吸血消化 24 h 后，雌、雄成蚤的中肠肠粘膜内出现大量的红色脂滴（图版Ⅰ：2,3），随消化时间的延长，至消化 72 h 后脂滴数量明显减少（图版Ⅰ：4）；消化 24 h 后雌蚤卵母细胞内出现微小脂滴（图版Ⅰ：2）。缓慢细蚤吸血后消化不同时间雌、雄成蚤的中肠内均未见或偶见少量的脂滴（图版Ⅰ：5），与不等单蚤存在明显差异；而雌蚤卵母细胞胞浆中亦可见微小的脂滴（图版Ⅰ：5）。

2.2 非特异性酯酶

2 种新羽化蚤非特异性酯酶主要存在于神经节细胞、唾液腺及其分泌物内，中肠、脂肪体存在微弱酶活性，卵原细胞、精子束呈阴性反应（图版Ⅰ：6,7）。

吸血后，2 种蚤中肠、唾液腺分泌物非特异性酯酶活性明显增强，不同消化时间中肠酶活性差异不显著（图版Ⅰ：8 ~ 10）。吸血后不等单蚤中肠酶活性强于缓慢细蚤（图版Ⅰ：9，10）。不等单蚤唾液腺细胞酶活性较其分泌物弱；而缓慢细蚤则唾液腺细胞酶活性较其分泌物强，腺体均以内膜酶活性较强（图版Ⅰ：10，11）。

吸血后 2 种蚤卵母细胞逐渐发育成熟。不等单蚤发育中，卵母细胞滤泡上皮下方胞浆内出现细小红色颗粒，随发育的进行，颗粒逐渐增多直至占据整个胞质，此时酶活性最强；发育进行到末期，颗粒进一步增粗增大，而酶活性则减弱。缓慢细蚤卵母细胞内酯酶活性明显低于不等单蚤（图版Ⅰ：12 ~ 15）。2 种蚤雌性冰冻组织切片平均黑度检测值（表 1）表明每种蚤吸血后不同消化时间与新羽化相比，差异极显著；不等单蚤与缓慢细蚤对应部位相比，差异也极显著。

3 讨论

不等单蚤吸血蚤中肠肠粘膜细胞内可见大量红色脂滴，是吸入血食在中肠脂肪酶作用下分解为小

表 1 不等单蚤和缓慢细蚤雌蚤冰冻组织切片非特异性酯酶反应平均黑度水平（平均值 ± 标准差）

Table 1 Grouped average black level of the activity of esterase reaction in females of two rat flea species（mean ± *SD*）

	不等单蚤 *Monopsyllus anisus*		缓慢细蚤 *Leptopsylla segnis*	
	中肠 Midgut	卵母细胞 Oocytes	中肠 Midgut	卵母细胞 Oocytes
新羽化 Newly emerged	86.88 ± 9.56	71.94 ± 10.39	85.08 ± 5.65	69.43 ± 5.39
吸血后 After blood ingestion				
24 h	145.41 ± 8.75 *△	167.60 ± 6.78 *△△	135.88 ± 8.49 *	119.19 ± 8.38 *
48 h	149.38 ± 6.36 *△△	169.47 ± 6.83 *△△	133.18 ± 5.04 *	124.56 ± 7.48 *
72 h	145.84 ± 6.78 *△△	165.55 ± 6.43 *△△	134.55 ± 8.12 *	126.24 ± 6.48 *

* 表示吸血后不同消化时间与新羽化相比差异达极显著水平 Indicating extremely significant difference between the newly emerged and engorged adults（$P < 0.01$）；△△表示不等单蚤与缓慢细蚤对应部位相比差异极显著 Indicating significant difference between *M. anisus* and *L. segnis* in the same tissue（△ $P < 0.05$，△△ $P < 0.01$）.

分子脂类物质，被肠粘膜细胞吸收所致；而缓慢细蚤中肠内未见或少见脂滴，2 种蚤存在显著性差异。新羽化雌蚤卵原细胞内没有脂滴的存在，吸血 24 h 后，随卵母细胞发育，均见到 2 种蚤的卵母细胞中出现微小脂滴。脂滴的出现可能与卵母细胞的发育成熟有关。

吸血后，2 种蚤中肠上皮细胞非特异性酯酶反应明显增强。酯酶主要作用于短链脂肪酸（C_2 – C_4），其活性大小是体内酯类代谢的重要标志，酯酶反应增强说明中肠存在活跃的酯代谢。不等单蚤吸血后中肠脂滴含量明显多于缓慢细蚤，其相应酯酶反应也较缓慢细蚤强。

除中肠外，唾液腺也存在大量酯酶。Cheeseman 等（2001）曾用 SDS-PAGE 从猫栉首蚤唾液腺中测出高活性的酯酶存在。吸血后不等单蚤唾液腺细胞酶反应较其分泌物弱，缓慢细蚤唾液腺细胞酶反应则较其分泌物强，缓慢细蚤唾液腺酯酶反应较不等单蚤强。

吸血后，2 种蚤卵母细胞非特异性酯酶反应明显增强。酯酶反应升高说明卵母细胞中有活跃的脂代谢。不等单蚤卵母细胞酯酶反应明显较缓慢细蚤强，其脂代谢也更为活跃。Shchedrin 等（1978）认为卵母细胞非特异性酯酶的反应依赖于它的发育阶段：排卵前发育接近成熟的卵母细胞胞浆中含有很多酯酶，而发育早期的未分化卵母细胞酯酶反应为阴性，且在卵黄成熟末期，卵母细胞滤泡上皮内也存在酯酶。这与本实验中观察到的现象相一致。

蚤消化道前胃菌栓的形成是其传播鼠疫的特异性机制。钱存宁等（1987）认为，新疆方形黄鼠蚤阿尔泰亚种 *Citellophilus tesquorum altaicus*（Ioff，1936）幼龄蚤和成龄蚤在菌栓形成率上的差异除吸血量不同等生理差异外，消化道酶系统的差异可能是其基本因素。何晋侯等（2001）研究发现云南不等单蚤和缓慢细蚤感染鼠疫菌的菌栓形成率不同，前者为 38%，后者为 3.7%，具有明显差异。我们观察到消化道非特异性酯酶吸血后酶反应较未吸血新羽化蚤增强，且不等单蚤吸血后中肠脂滴含量明显较缓慢细蚤多，其中肠非特异性酯酶反应也较缓慢细蚤强。消化道非特异性酯酶在新羽化蚤和吸血蚤的差异，以及 2 种蚤脂类和非特异性酯酶的种间差异是否对其菌栓形成有影响，尚有待进一步研究。

参考文献（References）

Bai MK，1972. Studies on host-flea relationship：Part 1，Histochemistry of egg folk in *Xenopsylla cheopis*（Roths.）and *Xenopsylla astia*（Roths.）. *J. Med. Res.*，60（5）：752 – 756.

Cheeseman MT，Bates PA，Crampton JM，2001. Preliminary characterizationof esterase and platelet-activating factor（PAF）-acetylhydrolase activities fromcat flea（*Ctenocephalides felis*）salivary glands. *Insect Biochem. Mol. Biol.*，31（2）：157 – 164.

Du ZM，1998. Practical Histochemical Techniques. Beijing：People's Medical Publishing House. 321.［杜卓民，1998. 实用组织学技术. 北京：人民卫生出版社. 321］

He JH，Liang Y，Zhang HY，Zhao WH，Wu MS，Hu XL，Yang ZM，2001. A study on the transmissions of plague for seven flea species of plague foci of domestic and field rat in Yunnan. *Chinese Journal of Control of Endemic Diseases*，16（Special Issue）：1 – 7.［何晋侯，梁云，张洪英，赵文红，吴明寿，胡晓玲，杨智明，2001. 云南家野两型鼠疫疫源地 7 种主要蚤类传播鼠疫的研究. 中国地方病防治杂志，16（特刊）：1 – 7］

Liu YP，Tan JA，Shen EL，2000. The Atlas of Plague and its Environment in the People's Republic of China. Beijing：Science Press. 72 – 73.［刘云鹏，谭见安，沈尔礼，2000. 中华人民共和国鼠疫与环境图集. 北京：科学出版社. 72 – 73］

Pearse AGE（Translated by Ma ZK），1965. Histochemistry. Beijing：People's Medical Publishing House. 661.［皮尔斯（马仲魁译），1965. 组织化学. 北京：人民卫生出版社. 661］

Qi YM，1984. Fine structures of the reproductive system of three flea species：Development of male gonads. *Acta Entomol. Sin.*，27（1）：57 – 63.［漆一鸣，1984. 三种蚤生殖系统发育的细微结构：雄性生殖腺的发育. 昆虫学报，27（1）：57 – 63］

Qian CN，Zhang XX，Feng YM，1987. Experimental formation of masses of plague bacilli in *Citellophilus tesquorum altaicus* of different physiological ages. *Endemic Diseases Bulletin*，2（2）：37 – 39.［钱存宁，张晓雪，冯玉明，1987. 不同龄期方形黄鼠蚤阿尔泰亚种菌栓形成试验. 地方病通报，2（2）：37 – 39］

Shchedrin VI，Beier AP，Loktev NA，Akiev AK，1975. Morphological and histochemical changes in the flea *X. cheopis*（Roths.）infected with plaque bacilli. *Med. Parazitol.*，44（1）：86 – 89.

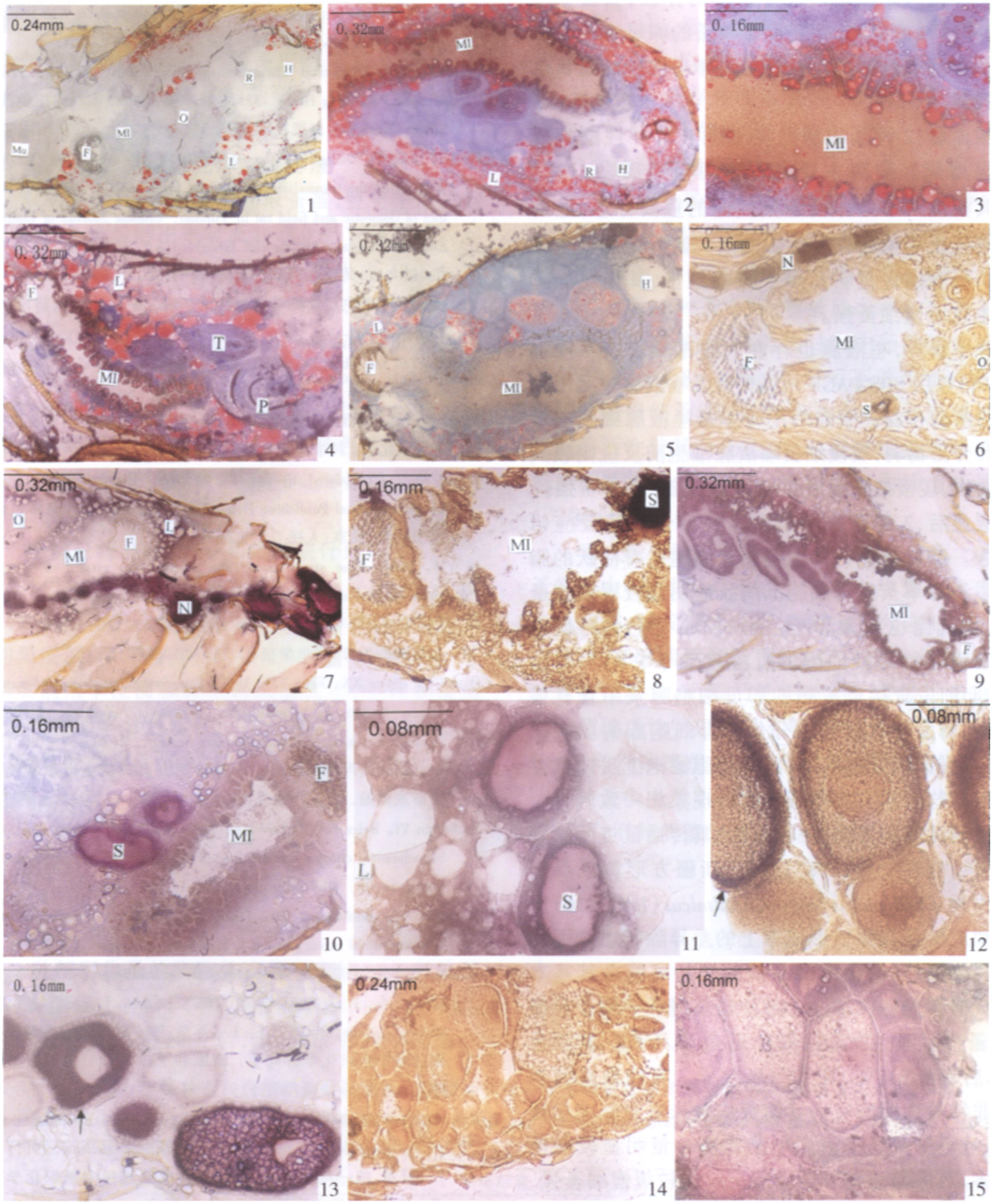
Shchedrin VI，Briukhanova LV，Lunina EA，1978. A contribution to the histoenzymatical investigation of flea. *J. Med. Parazitol.*，47（1）：89 – 91.

Xun H，Qi YM，2002. Histochemistry study on mature process of two species of rat fleas Ⅰ：Glycogen and PAS substance. *Journal of Guiyang Medical College*，27（1）：1 – 3.［寻慧，漆一鸣，2002. 两种鼠蚤成熟过程中组织化学研究Ⅰ：糖原和 PAS 物质. 贵阳医学院学报，27（1）：1 – 3］

Xun H，Qi YM，2004a. Histochemistry study on mature process of two species of rat fleas Ⅱ：Protein. *Endemic Diseases Bulletin*，19（1）：5 – 7.［寻慧，漆一鸣，2004a. 两种鼠蚤成熟过程中组织化学研究Ⅱ：蛋白质. 地方病通报，19（1）：5 – 7］

Xun H，Qi YM，2004b. Histochemistry of three enzymes in newly emerged and engorged adults of rat fleas *Monopsyllus anisus*（Rothschild）and *Leptopsylla segnis*（Schönherr）. *Acta Entomol. Sin.*，47（4）：444 – 448.［寻慧，漆一鸣，2004b. 两种鼠蚤在新羽化和吸血后不同时间三种酶的组织化学研究. 昆虫学报，47（4）：444 – 448］

（责任编辑：黄玲巧）



1－5. 脂肪 Fat: 1. 新羽化缓慢细蚤 *L. segnis*, the newly emerged, ♀(33×); 2. 不等单蚤 *M. anisus*, 24 h after blood ingestion, ♀(25×); 3. 不等单蚤 *M. anisus*, 24 h, ♀(50×); 4. 不等单蚤 *M. anisus*, 72 h, ♀(25×); 5. 缓慢细蚤 *L. segnis*, 24 h, ♀(25×). 6－15. 非特异性酯酶 EST: 6. 新羽化不等单蚤石蜡切片 *M. anisus*, the newly emerged, ♀(50×); 7. 新羽化缓慢细蚤 *L. segnis*, the newly emerged, ♀(25×); 8. 不等单蚤石蜡切片 *M. anisus*, 48 h, ♀(50×); 9. 不等单蚤 *M. anisus*, 48 h, ♀(25×); 10. 缓慢细蚤 *L. segnis*, 48 h, ♀(50×); 11. 不等单蚤 *M. anisus*, 48 h, ♀(100×); 12. 不等单蚤石蜡切片 *M. anisus*, 24 h, ♀(100×); 13. 不等单蚤 *M. anisus*, 24 h, ♀(50×); 14. 缓慢细蚤石蜡切片 *L. segnis*, 24 h, ♀(33×); 15. 缓慢细蚤 *L. segnis*, 24 h, ♀(50×). Mu: 肌肉 Muscle; F: 前胃 Proventriculus; MI: 中肠 Midgut; O: 卵原细胞 Undifferentiated oocyte; L: 脂肪体 Fat body; R: 直肠垫 Rectal pad; H: 后肠 Hindgut; T: 睾丸 Testis; P: 阳茎 Penis; N: 神经索 Nerve chain; S: 唾液腺 Salivary gland.